Aus der Abteilung Innere Medizin IV
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. M. Eggstein
der Medizinischen Klinik
der Universität Tübingen

UNTERSUCHUNGEN ZUM BINDUNGSVERHALTEN UND ZUR ENZYMKINETIK EINES IgA – AMYLASE – KOMPLEXES (MAKROAMYLASE)

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Wolfgang Thomas Dieter Ils

aus Neu-Ulm

1983

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547619_0008

Aus der Abteilung Innere Medizin IV
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. M. Eggstein
der Medizinischen Klinik
der Universität Tübingen

UNTERSUCHUNGEN ZUM BINDUNGSVERHALTEN UND ZUR ENZYMKINETIK EINES IgA – AMYLASE – KOMPLEXES (MAKROAMYLASE)

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Wolfgang Thomas Dieter Ils

aus Neu-Ulm

1983

Dekan: Professor Dr. W. Frommhold

1. Berichterstatter: Professor Dr. M. Eggstein

2. Berichterstatter: Frau Professor Dr. R. Rössler

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Für Ulrike
und
Meinen Eltern

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. M. Eggstein in der Zeit von November 1978 bis Mai 1981 in der Medizinischen Klinik, Abt. IV, der Eberhard-Karls-Universität Tübingen durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. M. Eggstein danke ich für sein großes Interesse bei der Durchführung der Arbeit.
Herrn Dr. Bohner und Herrn Dr.Dr. Stein danke ich im besonderen für die intensive Betreuung bei der Planung, Durchführung und Diskussion der Versuche.

I N H A L T

1. EINLEITUNG 1

2. METHODIK 5

2.1. Allgemeine Methodik 5
2.1.1. Gelchromatographie 5
2.1.2. Bestimmung der Amylaseaktivität 6

2.2. Abschätzung des Molekulargewichts des Amylase - Immunglobulin - Komplexes .. 10
2.2.1. Gelchromatographie 10
2.2.2. Bestimmung der Amylaseaktivität 10
2.2.3. Abschätzen des Molekulargewichts 11

2.3. Präparation der amylasebindenden Proteinfraktion (ABPF) 12
2.3.1. Gelchromatographie 12
2.3.2. Konzentrierung der ABPF 13

2.4. Bindungsverhalten von Isoamylasen an die amylasebindende Proteinfraktion .. 14
2.4.1. Herstellen von Antikörper - Amylase - - Komplexen 14
2.4.2. Gelchromatographie 15

2.5. Beeinflussung der Amylaseaktivität durch die Immunglobulinbindung 17
2.5.1. Materialien 17
2.5.2. Durchführung 17

2.6. Temperaturverhalten der katalytischen Aktivitäten der Isoamylasen und Makroamylase 18
2.6.1. Seren, Amylaseansätze 18
2.6.2. Durchführung 18

3. ERGEBNISSE 20

3.1. Abschätzung des Molekulargewichts des Amylase - Immunglobulin - Komplexes ... 20

3.2. Präparation der amylasebindenden Proteinfraktion 22

3.3. Bindungsverhalten von Isoamylasen an die amylasebindende Proteinfraktion 24

3.4. Beeinflussung der Amylaseaktivität durch die Immunglobulinbindung 38

3.5. Temperaturverhalten der katalytischen Aktivitäten der Isoamylasen und Makroamylase 39

4. DISKUSSION 42

5. ZUSAMMENFASSUNG 53

6. LITERATURVERZEICHNIS 55

cxcxcxcxcxcxcxcxcxcxcxcxcxcxcxcxcxcxcxcxcxcxcxcxcxcxcxcxcxcxcxcxcxc

ABKÜRZUNGEN:

Tab. = Tabelle
Abb. = Abbildung
Vol. = Volumen

ABPF = amylasebindende Proteinfraktion

1. EINLEITUNG

Eine erhöhte Serumamylaseaktivität kann entweder durch die vermehrte Freisetzung des Enzyms aus einem erkrankten Organ, wie bei der akuten Pankreatitis und Parotitis, oder durch die verminderte renale Elimination des im Blut zirkulierenden Enzyms verursacht werden. Der zweite Mechanismus wird bei der Makroamylasämie angenommen. Hier liegt ein Komplex aus Amylase und einem Bestandteil des Serums vor, der aufgrund seiner Größe nicht mehr renal filtriert werden kann.

1964 wurde dieses Phänomen von WILDING et al. (37) erstmals beschrieben. BERK et al. (2) schlugen 1967 für den Amylasekomplex den Namen Makroamylase vor.

Als Ursache einer Makroamylasämie ist die Bindung von Amylase an Polysaccharide (33), Proteine oder Glykoproteine des Serums möglich (21). Daneben wird eine Aggregation von Amylasemolekülen an Immunglobuline mehrfach beschrieben (13, 14, 15, 22, 25, 26, 27).

Die Makroamylasämie ist damit von heterogener Natur: Bei den über 100 Fällen, die in der Weltliteratur beschrieben sind (11), gibt es erhebliche Unterschiede bezüglich Größe, Beschaffenheit, elektrophoretischem Verhalten und Dissoziation des Makroamylasekomplexes sowie seiner Persistenz im Blut des Patienten.

LEVITT et al. (26) unterscheiden zwei Formen der Makroamylase: eine mit einem Molekulargewicht von über 200.000 (Sedimentationskoeffizient 11S), die bei pH 3,4 in das bindende Protein und die normalgroße Amylase dissoziiert, und eine mit einem Mole-

kulargewicht von 160.000 (7S), die bei saurem pH in der Regel nicht dissoziiert. Bei der ersteren Form konnte ein Immunglobulin als Komplexpartner nachgewiesen werden (13,25). Die Makroamylaseform der zweiten Art läßt sich in manchen Fällen durch niedermolekulare Stärke dissoziieren, sodaß die amylasebindenden Substanzen möglicherweise Polysaccharide oder Glykoproteine sind (24).

Einen eigenständigen Krankheitswert besitzt die Makroamylasämie nach dem derzeitigen Kenntnisstand nicht. Auch läßt sie sich offenbar keinem eigentlichen Krankheitsbild zuordnen. Bei der Differentialdiagnose einer Hyperamylasämie muß die Makroamylasämie ausgeschlossen werden (36).

Um einen Hinweis über die Häufigkeit der Makroamylasämie zu erhalten, wurden Feldstudien in den USA (1, 16), in Schottland (19) und im deutschsprachigen Raum (10) durchgeführt. Unter den hospitalisierten Patienten ergibt sich eine Häufigkeit von 1,1 - 2,0 %; in der Gesamtbevölkerung liegt die Häufigkeit unter 0,4 %. Am Universitätsklinikum Tübingen wurde nach Entdekkung des hier beschriebenen Falles retrospektiv die rechnergespeicherte Patientendatei nach der typischen Konstellation von erhöhter Serumamylase bei gleichzeitig normaler Urinamylase aufgesucht und die Daten von 27.000 Patienten analysiert. Bei den 848 Patienten, auf die diese Konstellation zutraf, waren in den meisten dieser Fälle Pankreatitis, Parotitis oder Niereninsuffizienz Ursache der Hyperamylasämie. (5).

Bei einer 55jährigen Patientin mit schwer einstellbarem, insulinpflichtigem Diabetes mellitus war eine über den Beobachtungszeitraum von 8 Monaten persistierende, ausgeprägte Hyperamylasämie nachweisbar (5).

Die α - Amylaseaktivität im Serum lag zwischen 2000 U/L und 2900 U/l (obere Normgrenze: 201 U/l). Die Urinamylase lag unterhalb 200 U/l (Norm: bis 660 U/l). Das Verhältnis von Amylase- zu Kreatininclearance (C_{am}/C_{cr} = 0,01 bis 0,1) war erniedrigt. Die Lipasewerte im Serum waren unauffällig (5).

Klinisch, röntgenologisch und sonographisch ergab sich kein Hinweis auf krankhafte Veränderungen des exokrinen Pankreas und der ableitenden Gallenwege. Die Patientin hatte keine Parotitis. Normale glomeruläre und tubuläre Clearancewerte schlossen eine renale Ursache der Hyperamylasämie aus. Für ein Tumorleiden gab es keinen Anhalt (5).

Zum Ausschluß einer Autoaggressionskrankheit wurden die folgenden immunologisch - serologischen Befunde erhoben: Direkter und indirekter Coombs-Test negativ. Immunelektrophorese und quantitative Bestimmung der Immunglobuline IgG, IgA, IgM, IgD und IgE unauffällig. Die Nachweise auf antinukleäre Faktoren, mitochondriale Antikörper, Antikörper gegen glatte Muskulatur sowie mikrosomale Antikörper gegen Schilddrüsengewebe und Magenschleimhaut fielen ausnahmslos negativ aus. Insbesondere fanden sich keine zirkulierende Antikörper gegen Schweine- oder Rinderinsulin (5).

Als Ursache der persistierenden Hyperamylasämie wurde mittels Ausschlußchromatographie Makroamylase nachgewiesen. Harn und Speichel der Patientin enthielten dagegen lediglich normalgroße Amylase (32).

Weitere Untersuchungen ergaben, daß Amylase einen Komplex mit einem Immunglobulin vom Typ IgA (Leichtketten vom Kappa-Typ) bildet (5). Das Serum hat freie Bindungskapazitäten für Amylase. Der Amylase - IgA - - Komplex ist bei pH 3,4 nahezu vollständig dissoziiert (39).

Durch Gelchromatographie wird Makroamylase bei pH 3,4 in eine amylasefreie Proteinfraktion, die amylasebindende Immunglobuline enthält, und in eine Fraktion mit normalgroßer Amylase aufgetrennt (12).

In dieser Arbeit

1. wird die amylasebindende Proteinfraktion präparativ dargestellt (ABPF),
2. das Bindungsverhalten von Isoamylasen (heterologe Pankreasamylase vom Schwein, homologe Pankreasamylase und autologe Speichelamylase) an die ABPF geprüft und die Spezifität der Bindung dieser Isoamylasen an die ABPF dargestellt.
3. Darüberhinaus wird untersucht, ob die katalytische Aktivität der Amylase durch die Immunglobulinbindung beeinflußt wird.
4. Das Temperaturverhalten der katalytischen Aktivitäten von Isoamylasen und Makroamylase wird untersucht.
5. Es werden Angaben zum Molekulargewicht des Immunglobulinkomplexes mitgeteilt.

2. METHODIK

2.1. Allgemeine Methodik

2.1.1. Gelchromatographie

Geräte

- Pumpe: LKB 2120 Varioperpex^{R} II Pump
- Säule und Zubehör: Verwendet wurden Säulen verschiedener Länge, gepackt mit Sephadex^{R} G 100 oder Sephadex^{R} G 200 sf
- Photometer zur Bestimmung des Proteins: LKB Uvicord Type 4701 A
- Schreiber: LKB 2110 1-Channel-Recorder
- Fraktionssammler: LKB 2112 Redirac Fraction Collector
- Hamiltonspritze 250 µl

Chemikalien

- Tris - HCl - Puffer (pH 7,2):
  50 mmol/l Tris (-hydroxymethyl) -aminomethan,
  Merck Art. 8387,
  20 mmol/l NaCl, Merck Art. 6404,
  20 mmol/l $CaCl_2$, Merck Art. 2083,
  200 mg/l NaN_3, Merck Art. 8688
  und 25% HCl, Merck Art. 312

- Glycin - Puffer (pH 3,4):
  50 mmol/l Glycin, Merck Art. 4201,
  20 mmol/l $CaCl_2$, Merck Art. 2083,
  200 mg/l NaN_3, Merck Art. 8688
  und 10% NaOH, Merck Art. 5588

- Sephadex^{R} G 100 und Sephadex^{R} G 200 superfine, Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala

Ausschlußchromatographie

Die schematische Darstellung des Chromatographensystems ist in Abb. 1 wiedergegeben.
Die mobile Phase wird unter konstantem Fluß über Säule und Photometer zum Fraktionssammler gepumpt. Serum wird je nach Säulengröße mit einer Hamiltonspritze (250 µl) oder mit einer handelsüblichen Plastikspritze (3 ml oder 5 ml) durch ein Septum auf das Säulenbett aufgetragen. Bei 254 nm wird die Eiweißkonzentration des Eluats auf dem Schreiber kontinuierlich registriert. Fraktionsvolumen und Papiervorschub des Schreibers werden durch die Pumpe gesteuert und durch den Schreiber registriert.

2.1.2. Bestimmung der Amylaseaktivität

Kinetische UV - Methode

- UltraZymePlus^{R} α - Amyl, Harleco 64 982

  Prinzip:

  Oligosaccharide (4-1o Glucose) $\xrightarrow{\text{α-Amylase}}$ Maltose

  Maltose $\xrightarrow{\text{α-Glucosidase}}$ 2 Glucose

  Glucose + ATP $\xrightarrow{\text{Hexokinase}}$ Glucose-6-Phosphat + ADP

  Glucose-6-Phosphat + NAD^{+} $\xrightarrow{\text{Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase}}$ 6-Phosphogluconat + NADH + H^{+}

  Die Konzentration des NADH wird im optischen Test bei 334 nm gemessen.

  Abweichend von den Angaben des Herstellers wird diese Methode modifiziert:

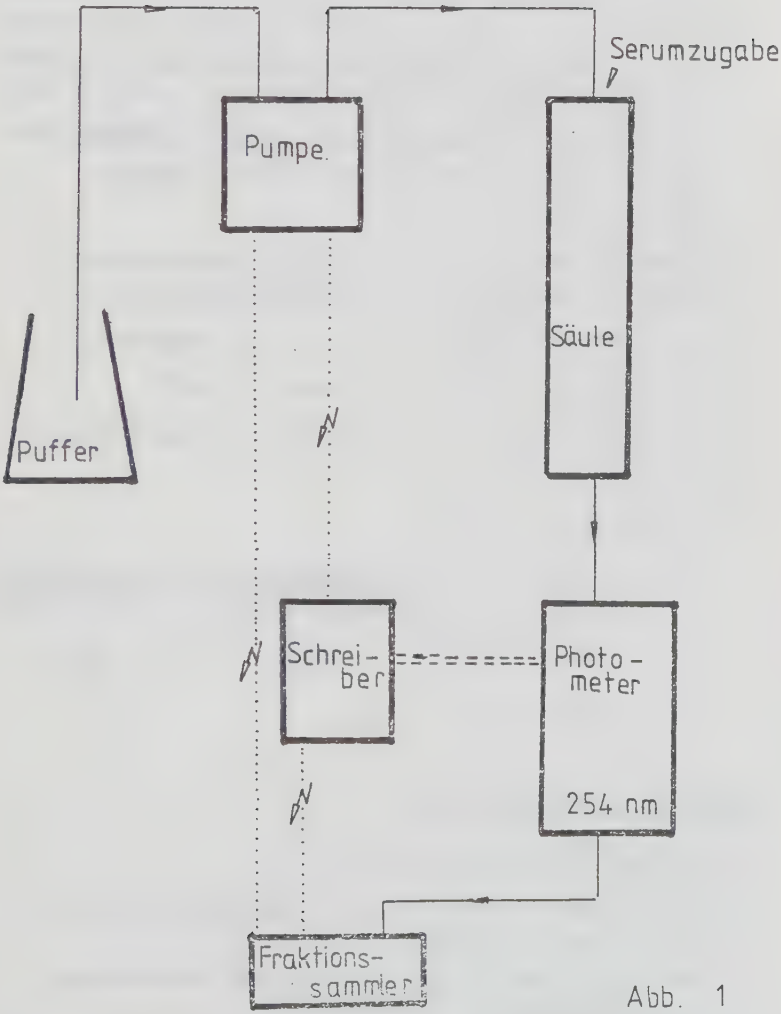


Abb. 1

GERÄTE-
AUFBAU

- Messung bei 37° C anstatt bei 25° C
- Substratvolumen 600 µl und Probevolumen 50 µl anstatt Substratvolumen von 1000 µl und Probevolumen von 10 µl

Begründung:

- 50 µl können mit besserer Präzision als 10 µl pipettiert werden
- Bei größeren Probemengen und höherer Temperatur können kleinere Aktivitäten genauer gemessen werden.

Photometer: Eppendorf M 1101 mit Küvettenwechselautomat 2705 und Kompensationsschreiber 6511.

Neuer Umrechnungsfaktor: Anstatt wie angegeben

α - Amylase U/l (25°C) = ΔE/min x 8171

beträgt der Umrechnungsfaktor bei der modifizierten Methode:

α - Amylase U/l (37°C) =

$$= \Delta E/min \times 8171 \times \frac{\text{Gesamtvol.neu}}{\text{Gesamtvol.alt}} \times \frac{\text{Probevol.alt}}{\text{Probevol.neu}}$$

$$= \Delta E/min \times 8171 \times \frac{650}{1010} \times \frac{10}{50}$$

$$= \Delta E/min \times 1052$$

Amyloklastische Methoden

- Merckotest® α - Amylase Art. 3301

  Prinzip: Messung der Extinktionsabnahme von Jod-Amylose-Komplexen bei 623 nm.
  Diese Methode wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

- Phadebas® Amylase Test with BSA. Pharmacia Diagnostics AB, Uppsala

Prinzip:
Substrat: Quervernetztes Stärkepolymer mit kovalent gebundenem Cibacron Farbstoff.
Reaktion: Hydrolysierung durch α- Amylase zu wasserlöslichen blauen Fragmenten.
Messung der Extinktionszunahme bei 623 nm.
Diese Methode wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.2. Abschätzung des Molekulargewichts des Amylase - - Immunglobulinkomplexes

2.2.1. Gelchromatographie

Chemikalien und Geräte

- Tris - HCl - Puffer (pH 7,2)
- Sephadex^{R} G 100
- Sephadex^{R} G 200 superfine
- Säule 60 cm / Ø o,9 cm

Säulenkenngrößen

- Gelbetthöhe 550 mm
- Gelbettdurchmesser 9 mm
- Bettvolumen 35,o ml
- Flußrate ca. 12,7 µl/min
- Fraktionsvolumen 380 µl
- Fraktionsdauer ca. 30 min
- Zahl der gesammelten Fraktionen 100
- Dauer eines Säulendurchlaufs ca. 50 h

Versuchsaufbau

siehe Abb. 1

Eine in etwa 5 mm hohe Schicht aus Sephadex^{R} G 100 an den beiden Säulenenden verhindert das Durchtreten der Sephadex^{R} - superfine - Teilchen durch die Fritte.

2.2.2. Bestimmung der Amylaseaktivität

Zur Bestimmung der Amylaseaktivität wird jede zweite

Fraktion mit der kinetischen UV - Methode (Harleco) auf Amylase untersucht. Im Bereich der Wendepunkte und des Maximums der Amylaseaktivität wird jede Fraktion gemessen.

2.2.3. Abschätzen des Molekulargewichts

Aus den relativen Elutionsvolumina läßt sich das Molekulargewicht einer Substanz abschätzen (30).

2.3. Präparation der amylasebindenden Proteinfraktionen (ABPF)

2.3.1. Gelchromatographie

Chemikalien und Geräte

- Glycin - Puffer (pH 3,5)
- Tris - HCl - Puffer (pH 9,o)
- Sephadex^{R} G 100
- 1 N HCl, Merck Art. 9057
- pH-Meter: pH 39, Wiss. Techn. Werkstätten, Weilheim
- Säule 30 cm / ⌀ 2,5 cm

Säulenkenngrößen

- Gelbetthöhe 250 mm
- Gelbettdurchmesser 25 mm
- Bettvolumen 122,7 ml
- Flußrate ca. 0,8 ml/min
- Fraktionsvolumen 2,5 ml
- Fraktionsdauer ca. 3 min
- Zahl der gesammelten Fraktionen 50
- Dauer eines Säulendurchlaufs ca. 150 min

Durchführung

Versuchsaufbau siehe Abb. 1

Vorversuch: Um die Verteilung von Makroamylasekomplex und ungebundener Amylase auf die verschiedenen Fraktionen zu erkennen, wird bei pH 7,2 mit Tris-HCl-Puffer eluiert:

1. 2,5 ml Pankreatitisserum 1000 U/l
2. 2,5 ml nicht angesäuertes Serum der Makroamylasämiepatientin

Zur Präparation der ABPF werden 3 ml Makroamylaseserum mit 1N HCl auf pH 3,5 angesäuert. Die Mindestinkubationszeit bis zur Einstellung des Dissoziationsgleichgewichts beträgt 60 min (empirisch ermittelt).

Aufbringen von 2,5 ml angesäuertem Serum auf die Säule. Nach der Elution mit Glycin-Puffer (pH 3,5) wird jede Fraktion mit 500 µl Tris-HCl-Puffer (pH 9,6) sofort neutralisiert, um eine Denaturierung der ABPF oder der Amylase in den Fraktionen möglichst gering zu halten.

Mit der kinetischen UV-Methode (Harleco) werden die Fraktionen auf Amylaseaktivität untersucht.

2.3.2. Konzentrierung der ABPF

Die Fraktionen mit ABPF (siehe 3.2.) werden konzentriert. Dabei wird darauf geachtet, daß die Restamylaseaktivität gering ist. Fraktionen mit hohen Restamylaseaktivitäten werden verworfen.
Um in den Fraktionen die Proteinkonzentration des Serums zu erreichen, werden sie auf das Ursprungsvolumen von 2500 µl eingeengt. Dazu wird ein Konzentrator (MINICON ^{TM} B 15, Amicon GmbH, Witten/Ruhr) benutzt. Die ABPF von zehn Chromatographieläufen werden nach dem Einengen gepoolt und nochmals auf Restamylaseaktivität untersucht.

2.4. Bindungsverhalten von Isoamylasen an die amylasebindende Proteinfraktion (ABPF)

2.4.1. Herstellen von Antikörper-Amylase-Komplexen

Amylaselösungen

Pankreasamylase, homolog:
Duodenalsaft vom Menschen. Nach zweimaliger Filtration wird das Filtrat 10 min bei 3000 U/min zentrifugiert und nur der Überstand verwendet.

Speichelamylase, autolog:
Speichel der Patientin, wird wie Duodenalsaft behandelt.

Pankreasamylase vom Schwein, heterolog:
Gereinigter Pankreasextrakt von Schweinen: Pankreon^{R}, Kali-Chemie Pharma GmbH, Hannover. Wird in physiologischer Kochsalzlösung gelöst.

Alle drei Amylasearten werden mit physiologischer Kochsalzlösung auf eine geeignete Amylasekonzentration gebracht. Die Amylaseaktivität wird mit der kinetischen UV-Methode gemessen:

- Pankreasamylase ca. 9600 U/l
- Schweineamylase ca. 8300 U/l
- Salivaamylase ca. 7700 U/l

Inkubation

Eine konstante Menge von Antikörpern (ABPF) wird mit einer variablen Menge von Amylaselösung versetzt:

ABPF (siehe 2.3.) : 100 µl
Amylaselösungen: von 10 µl bis 500 µl .

Es ergeben sich Ansatzvolumina von 110 µl bis 600 µl.

Um eine ausreichende Reaktionszeit sicherzustellen, werden die Ansätze mindestens 90 min bei Zimmertemperatur inkubiert.

2.4.2. Gelchromatographie

Chemikalien und Geräte

- Tris - HCl - Puffer (pH 7,4)
- Sephadex^{R} G 100
- Säule 60 cm / ⌀ 0,9 cm

Säulenkenngrößen

- Gelbetthöhe 300 mm
- Gelbettdurchmesser 9 mm
- Bettvolumen 19,1 ml
- Flußrate ca. 0,375 ml/min
- Fraktionsvolumen 1000 µl
- Fraktionsdauer ca. 2,7 min
- Zahl der gesammelten Fraktionen 30
- Dauer eines Säulendurchlaufs ca. 80 min

Durchführung

Zunächst werden 100 µl einer Mischung von ungebundener Amylase (Schweineamylase) und Makroamylase auf die Säule aufgetragen, um das Elutionsprofil von Makroamylase und niedermolekularer Amylase festzulegen. Mit der kinetischen UV-Methode wird die Amylaseaktivität jeder Fraktion bestimmt.
Dann werden jeweils 100 µl eines Amylase - ABPF - Ansatzes auf die Säule aufgetragen. Aufgrund des Elutionsprofils (siehe 3.3.) werden die Fraktionen 7 - 11, 12 - 14 und 15 - 26 gepoolt. Mit der kinetischen

UV - Methode wird ihre Amylaseaktivität bei 37° C bestimmt.

Zur Bestimmung der Wiederfindung der Amylase wird die Amylaseaktivität des Amylase - ABPF - Ansatzes vor der Chromatographie kontrolliert. Hierzu muß der Ansatz aufgrund seiner hohen Amylaseaktivität zehn- bis sechzigfach verdünnt werden.

2.5. Beeinflussung der Amylaseaktivität durch die Immunglobulinbindung

2.5.1. Materialien

- ABPF (siehe 2.3.)
- Amylasen: Humanpankreasamylase, Schweinepankreasamylase und Speichelamylase (siehe 2.4.1.)
- Rinderalbuminlösung, 66 g/l, Dupont
- Puffergemisch: 1 Teil Tris-HCl-Puffer und 5 Teile Glycin-Puffer, mit HCL auf pH 7,3 eingestellt (entspricht den Ionenkonzentrationsverhältnissen in der ABPF)

2.5.2. Durchführung

Die Testreihe wird so gewählt, daß ein Einfluß auf die Enzymaktivität nur vom Zusatz der ABPF abhängig ist. Alle übrigen Testbedingungen bleiben unverändert. Dabei werden den Amylaseansätzen wahlweise Puffergemisch oder ABPF zugefügt, um gleiche Bedingungen zu gewährleisten. Der Zusatz von Albumin gewährleistet ein an das Humanserum adaptiertes Milieu.
Von jeder der drei Isoamylasen werden drei verschiedene Ansätze angesetzt:

- 1 Teil Amylase, 2 Teile ABPF und 30 Teile Albumin
- 1 Teil Amylase, 1 Teil ABPF, 1 Teil Puffergemisch und 30 Teile Albumin
- 1 Teil Amylase, 2 Teile Puffergemisch und 30 Teile Albumin

Zunächst wird Amylase und ABPF bzw. Puffer gemischt, 90 min bei Zimmertemperatur inkubiert und dann Albumin zugegeben. Anschließend wird die Amylaseaktivität mit der kinetischen UV-Methode in den neun Ansätzen als Fünffachbestimmung ermittelt.

2.6. Temperaturabhängigkeit der katalytischen Aktivitäten der Isoamylasen und Makroamylase

2.6.1. Seren, Amylaseansätze

Die Verdünnung der Amylaseansätze mit Albumin gewährleistet eine konstante Proteinkonzentration.

- Makroamylaseserum, ca. 2000 U/l, wird 1:20 mit Albumin verdünnt
- Serum eines Pankreatitispatienten, ca. 6000 U/L, 1: 60 mit Albumin verdünnt
- Serum eines Parotitispatienten, ca. 1500 U/l, 1 : 15 mit Albumin verdünnt
- Pankreassekret und Schweineamylase, wie in 2.5.2. mit 2 Teilen Puffer und 30 Teilen Albuminlösung angesetzt
- Pankreassekret und Schweineamylase, wie in 2.5.2. mit 2 Teilen ABPF und 30 Teilen Albuminlösung angesetzt
- Zur Verdünnung: Rinderalbuminlösung, 66 g/l, Dupont; Puffergemisch aus 1 Teil Tris-HCl-Puffer und 5 Teilen Glycin-Puffer, pH 7,3

2.6.2. Durchführung

Die Bestimmung erfolgt mit Hilfe der amyloklastischen Methoden:

- amyloklastische Methode (a) (Merckotest^{R}): Untersuchung aller oben aufgeführten Seren und Amylaseansätze
- amyloklastische Methode (b) (Phadebas^{R}): Untersuchung von Makroamylaseserum und Pankreatitisserum

In Dreifachbestimmung werden die Seren bzw. Ansätze bei

25°C, 30°C, 35°C, 40°C, 45°C, 50°C und 55°C

Reaktionstemperatur (Wasserbad) auf Amylaseaktivität untersucht.

3. ERGEBNISSE

3.1. Abschätzung des Molekulargewichts des Amylase - - Immunglobulinkomplexes

In Abb. 2 wird die Absorption bei 254 nm sowie die dazugehörige Kurve der Amylaseaktivität dargestellt. Daraus werden die Parameter zur Abschätzung des Molekulargewichts des Makroamylasekomplexes entnommen:

Elutionsvolumen der Makroamylase:

V_e = 38,5 Fraktionen à 380 µl = 14,6 ml

äußeres Volumen des Gelbettes:

V_o = 33 Fraktionen à 380 µl = 12,5 ml

Gesamtvolumen des Gelbettes: (siehe 2.2.)

V_t = 35 ml

Hieraus berechnet sich der Elutionskoeffizient k_{av} für den Makroamylasekomplex:

$$k_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o} = \frac{14{,}6 \text{ ml} - 12{,}5 \text{ ml}}{35{,}0 \text{ ml} - 12{,}5 \text{ ml}} = 0{,}09$$

Dieser für den Makroamylasekomplex auf Sephadex^R G 200 charakteristischen Stoffkonstanten k_{av} entspricht ein Molekulargewicht in der Größenordnung von 450.000 .

Abb. 2 : ZUR ABSCHÄTZUNG DES MOLEKULARGEWICHTS

Abszisse: Fraktionen à 380 µl

Ordinate: Absorption bei 254 nm (durchgezogene Linie)
Amylaseaktivität der Fraktionen (gepunktete Linie)

V_e = Elutionsvolumen der Makroamylase = 38,5 Fraktionen

V_o = äußeres Volumen = 33 Fraktionen

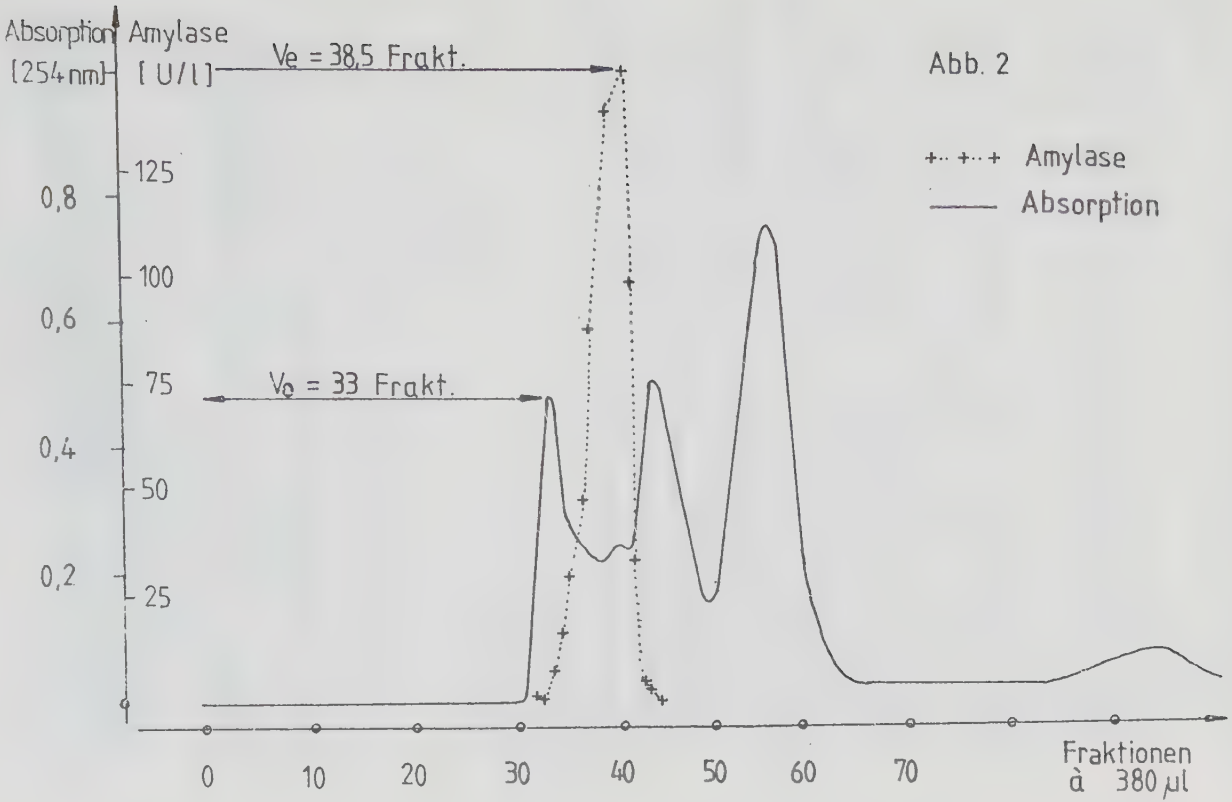


Abb. 2

+··+··+ Amylase

—— Absorption

3.2. Präparation der amylasebindenden Proteinfraktionen (ABPF)

Die Absorption bei 254 nm und die Amylaseaktivität der Gelchromatographie von Pankreatitisserum und Makroamylaseserum bei pH 7,2 und pH 3,5 ist in Abb. 3 dargestellt.
Die ABPF finden sich in den Fraktionen 14 - 23. Hier stellt sich in der Chromatographie von Makroamylasämieserum bei pH 7,2 der Hauptanteil der Amylaseaktivität dar; bei angesäuertem Serum (pH 3,5) dissoziiert die Makroamylase und es werden in diesen Fraktionen lediglich amylasebindende Proteine amylasefrei eluiert.
Die von den Immunglobulinen abgetrennte Amylase stellt sich in den Fraktionen 30 - 45 dar: Als Referenz diente ein Pankreatitisserum, dessen Amylaseanteil ebenfalls in den Fraktionen 30 - 45 eluiert wird.
Die Restaktivität der wieder konzentrierten ABPF betrug 16 U/l .

Abb. 3 : ZUR PRÄPARATION DER ABPF

Absorption bei 254 nm und Amylaseaktivität nach Chromatographie von Pankreatitisserum und Makroamylaseserum bei pH 7,2 und pH 3,5

Abszisse: Fraktionen à 2,5 ml
Ordinate: oben: Absorption bei 254 nm
unten: Amylaseaktivität der Fraktionen

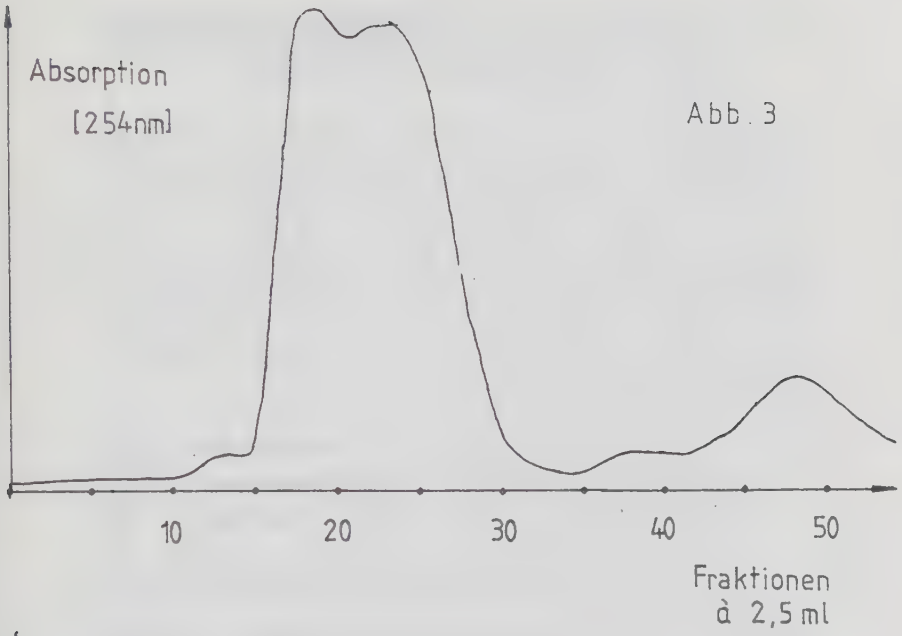
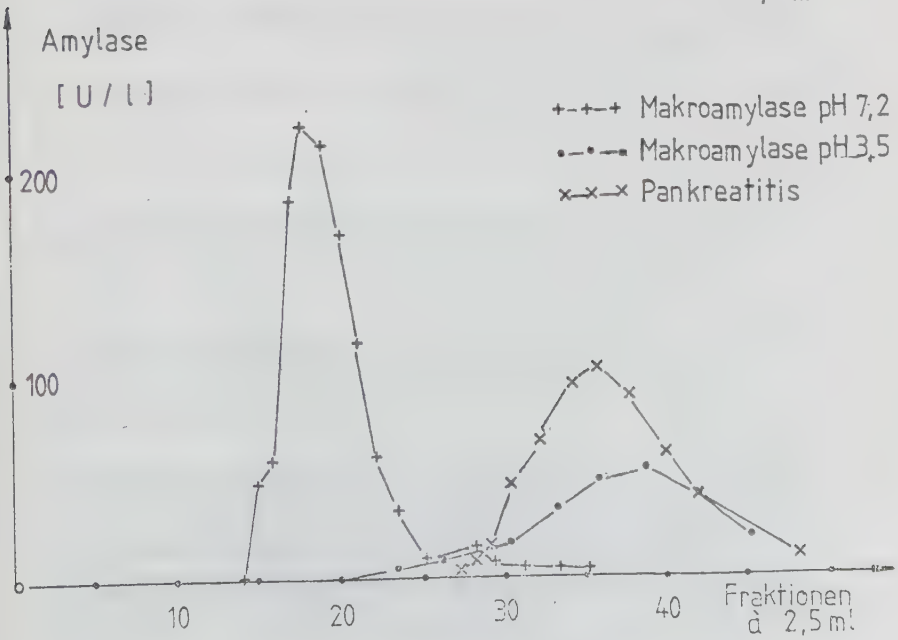

Absorption
[254nm]
10
20
30
40
50
Fraktionen
à 2,5 ml

Abb. 3


Amylase
[U/l]
200
100
+-+-+ Makroamylase pH 7,2
•-•-• Makroamylase pH 3,5
×-×-× Pankreatitis
10
20
30
40
Fraktionen
à 2,5 ml

3.3. Bindungsverhalten von Isoamylasen an die amylasebindende Proteinfraktion (ABPF)

Die Chromatogramme mit ungebundener Amylase und mit Makroamylase lassen erkennen, daß die Fraktionen 7 - 11 komplexgebundene und die Fraktionen 15 - 26 "freie" Amylase enthalten. In den Fraktionen 12 - 14 finden sich beide Amylaseformen. Als Beispiel ist eines dieser Chromatogramme in Abb. 4 dargestellt.

Bei den Chromatographien mit den Amylase - ABPF - - Ansätzen wird zunächst

(1) die Gesamtaktivität (GA) in mU der Pankreas- , Schweinepankreas- und Speichelamylase, die den ABPF zugegeben wird, durch Multiplikation der Amylaseaktivität (U/l) mit dem jeweiligen Volumen dieser Amylaselösung (ml) errechnet.

Nach der chromatographischen Auftrennung dieser Amylase - ABPF - Gemische wird die

(2) Aktivität des Makroamylase - Peaks (Fraktionen 7 - 11) (Einheit: mU)

und die

(3) Aktivität des Peaks der freien Amylase (Fraktionen 15 - 26) (Einheit: mU)

berechnet. Zusätzlich wird

(4) die Aktivität der Zwischenfraktionen (Fraktionen 12 - 14) (Einheit: mU)

ermittelt.
Aus (2) + (3) + (4) ergibt sich die nach der Chromatographie wiedergefundene Amylaseaktivität.
(1) entspricht der Gesamtaktivität vor der Chromatographie. Es läßt sich eine Wiederfindungsrate ausrechnen:

$$Wf = \frac{(2) + (3) + (4)}{(1)}$$

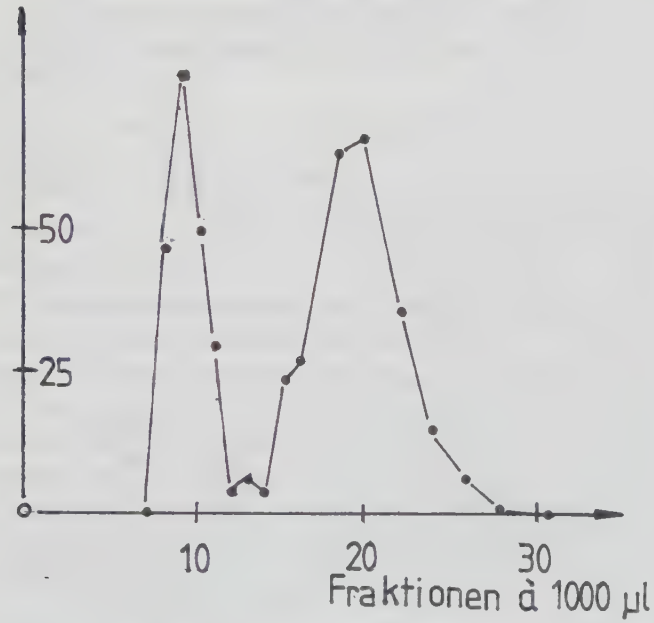


Abb. 4

Abb. 4 : ZUM BINDUNGSVERHALTEN VON ISOAMYLASEN AN ABPF

Kalibrierung der Gelchromatographie mit einer Mischung von Makroamylaseserum und niedermolekularer Amylase (Schweinepankreasamylase)

Fraktion 1 - 6 : äußeres Volumen
Fraktion 7 - 14 : Makroamylase
Fraktion 15 - 26 : niedermolekulare Amylase

Abszisse: Fraktionen à 1000 µl
Ordinate: Amylaseaktivität

Da anzunehmen ist, daß während der Chromatographie in allen Fraktionen gleichermaßen Amylaseaktivität verlorengeht, läßt sich die Aktivität des gebundenen Anteils an Amylase vor der Chromatographie errechnen (Abk.: MA) :

$$MA = \frac{(2)}{Wf} \quad \text{(in mU)} .$$

Analog ist die Aktivität des freien Anteils an Amylase vor der Chromatographie (Abk.: AML) :

$$AML = \frac{(3)}{Wf} \quad \text{(in mU)} .$$

Diese um die Wiederfindungsrate korrigierten Daten werden in Tab. 1 aufgeführt und sind in Abb. 5.1. und 5.2. graphisch dargestellt.

Nach Kapitel 3.4. nimmt die Aktivität der Amylase durch die Immunglobulinbindung zu. Die in Tab. 1 und Abb. 5.1. gemessenen Anteile an gebundener Amylase (MA) sind also durch diesen Effekt der Enzymaktivierung zu hoch wiedergegeben. Bei einem Verhältnis A8PF:AML = 2:1 liegt die gesamte Amylase an A8PF gebunden vor (siehe Abb. 8). Es kann somit ein Faktor F errechnet werden, der diese Aktivitätszunahme der Isoamylasen quantifiziert. Dieser Faktor beträgt für (vergleiche Tab. 4):

Pankreasamylase: $F = \frac{A8PF/AML(2:1)}{A8PF/AML(0:1)} = \frac{129,9\ U/l}{112,0\ U/l} = 1,16$

Schweineamylase: $F = \frac{A8PF/AML(2:1)}{A8PF/AML(0:1)} = \frac{144,3\ U/l}{106,6\ U/l} = 1,35$

Salivaamylase: $F = \frac{A8PF/AML(2:1)}{A8PF/AML(0:1)} = \frac{134,3\ U/l}{91,3\ U/l} = 1,47$

Die Aktivität der gebundenen Amylase (MA) aus Tab. 1 wird um den Faktor F korrigiert. Man erhält MA^+ :

$$MA^+ = MA : F$$

Entsprechend wird die zu hoch gemessene Gesamtaktivi-

tät reduziert:

$$GA^{+} = GA - (MA - MA^{+})$$

Diese korrigierten Daten sind in Tab. 2 und Abb. 6 dargestellt.

Zur Bindungscharakteristik der geprüften Isoamylasen in Abb. 5.1. und Abb. 6 :
Der Anteil an gebundener Amylase (MA; MA^{+}) nimmt im Anfangsteil der Kurven bei steigender Amylaseaktivität und konstanter ABPF - Konzentration in annähernd gleichem Ausmaß zu. Bei höheren GA - Aktivitäten bilden sich für Schweineamylase und Salivaamylase ähnliche Plateaukurven aus. Die Plateaukurve von Pankreasamylase liegt etwas höher. Wenn die Beeinflussung der Amylaseaktivität durch die Immunglobulinbindung korrigiert wird (Abb. 6), ist dieser Unterschied noch deutlicher. Die Bindungskapazität der Immunglobuline gegenüber Pankreasamylase ist offensichtlich größer als gegenüber den anderen untersuchten Isoamylasen.
Wird der Anteil an freier Amylase gegen die Gesamtaktivität aufgetragen (Abb. 5.2.), so ergeben sich annähernd lineare Beziehungen, die sich der x-Achse bei Gesamtaktivitäten unter 500 mU asymptotisch annähern. Der Anteil der freien Amylase nimmt proportional zur Gesamtaktivität zu, sobald alle Immunglobuline mit Amylase besetzt sind.

Die Daten aus Tab. 2 , bei denen die Beeinflussung der Amylaseaktivität durch die Immunglobulinbindung ausgeglichen worden ist, werden im Scatchard-Plot (29) ausgewertet.
Wie aus Abb. 6 ersichtlich, folgen einige Kurvenpunkte nicht dem regelrechten Kurvenverlauf. Sie wurden aus methodischen Gründen zu hoch oder zu niedrig

TAB. 1

PANKREASAMYLASE								
GA [mU]	97	194	290	484	726	968	1935	3870
MA [mU]	89	135	182	213	190	193	248	242
AML [mU]	ϕ	ϕ	25	140	318	514	1190	2768
Wf [%]	91,8	56,2	62,0	94,2	97,1	98,0	98,6	86,7

SCHWEINEAMYLASE							
GA [mU]	83	166	249	415	831	1662	3323
MA [mU]	77	104	158	201	200	265	253
AML [mU]	ϕ	23	92	162	507	1220	2614
Wf [%]	92,8	87,8	71,6	70,5	102	71,4	72,8

SALIVAAMYLASE									
GA [mU]	77	154	230	307	384	768	1535	2303	3839
MA [mU]	54	130	187	210	224	227	264	287	306
AML [mU]	ϕ	ϕ	5	6	152	265	901	1659	3250
Wf [%]	70,1	84,4	84,0	81,4	80,7	81,2	92,4	54,7	61,6

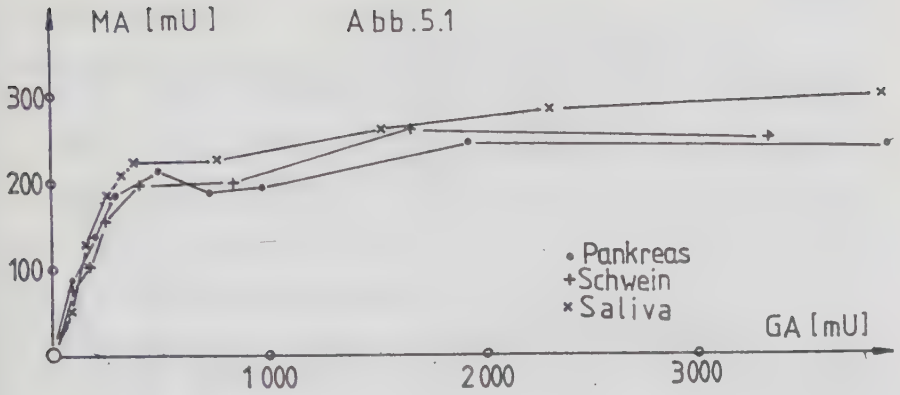
Tab. 1 : ZUM BINDUNGSVERHALTEN VON ISOAMYLASEN AN ABPF

GA = Gesamtaktivität vor der Chromatographie
= Aktivität der zugesetzten Amylase

Wf = Wiederfindungsrate

MA = Makroamylase
= korrigierter Anteil der gebundenen Amylase

AML = Amylase
= korrigierter Anteil der freien Amylase



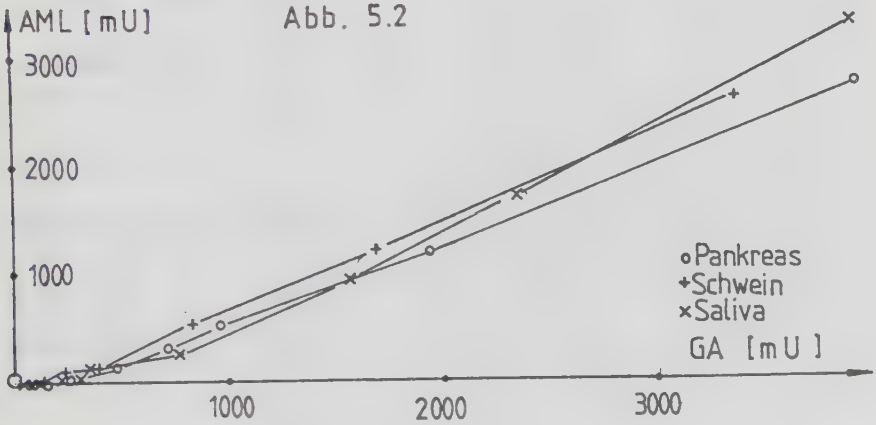


Abb. 5 : ZUM BINDUNGSVERHALTEN VON ISOAMYLASEN AN DIE ABPF

Graphische Darstellung der Daten von Tab. 1

Abszisse: Zugesetzte Amylaseaktivität (GA).
Die Konzentration der amylasebindenden Proteinfraktion wurde konstant gehalten.

Ordinate: Abb.5.1.: gebundener Anteil an Anmylase (MA)
Abb.5.2.: freier Anteil an Amylase (AML)

TAB. 2

PANKREASAMYLASE								
GA^+ [mU]	85	175	265	455	700	941	1901	3837
MA^+ [mU]	77	116	157	184	164	166	214	209
AML [mU]	ϕ	ϕ	25	140	318	514	1190	2768

SCHWEINEAMYLASE							
GA^+ [mU]	63	139	208	362	779	1593	3257
MA^+ [mU]	57	77	117	148	148	196	187
AML [mU]	ϕ	23	92	162	507	1220	2614

SALIVAAMYLASE									
GA^+ [mU]	60	112	170	240	312	695	1450	2211	3741
MA^+ [mU]	37	88	127	143	152	154	179	195	208
AML [mU]	ϕ	ϕ	5	6	152	265	901	1659	3250

Tab. 2 : ZUM BINDUNGSVERHALTEN VON ISOAMYLASEN AN DIE ABPF

Sättigungsversuche (wie in Tab. 1).

Hier wurde der Einfluß der Immunglobulinbindung auf die Amylaseaktivität ausgeglichen.

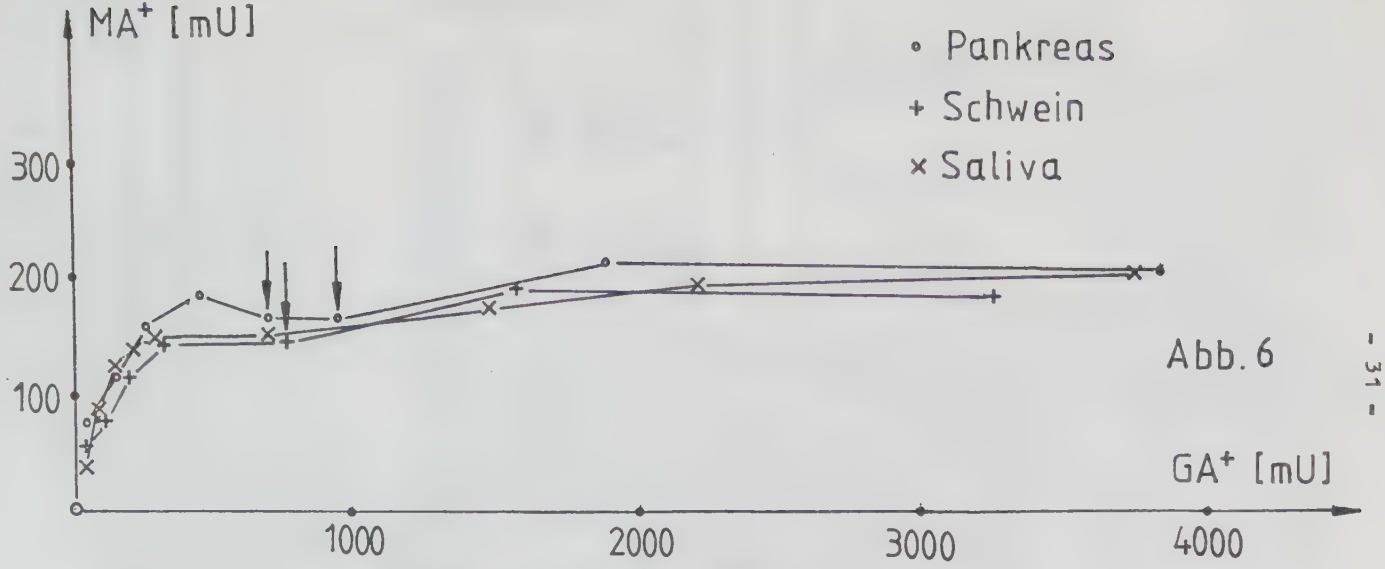


Abb. 6

Abb. 6 : ZUM BINDUNGSVERHALTEN VON ISOAMYLASEN AN DIE ABPF

Graphische Darstellung der Daten von Tab. 2 .

Abszisse: Zugesetzte Amylaseaktivität (GA^+)
Ordinate: Gebundener Anteil an Amylase (MA^+)

Der Pfeil kennzeichnet diejenigen Punkte, die nicht dem regelrechten Kurvenverlauf entsprechen und deshalb graphisch adaptiert werden.

TAB. 3

PANKREASAMYLASE						
GA^+[mU]	265	455	700	941	1901	3837
MA^+[mU]	157	187	*195*^{x}	*205*^{x}	214	209
AML[mU]	25	140	318	514	1190	2768
MA^+ / AML	6,28	1,31	0,61	0,40	0,18	0,08

SCHWEINEAMYLASE						
GA^+[mU]	139	208	362	779	1593	3257
MA^+[mU]	77	117	148	*170*^{x}	196	187
AML[mU]	23	92	162	507	1220	2614
MA^+/AML	3,35	1,27	0,91	0,34	0,16	0,07

SALIVAAMYLASE					
GA^+[mU]	312	695	1450	2211	3741
MA^+[mU]	152	154	179	195	208
AML[mU]	152	265	901	1659	3250
MA^+/AML	1,00	0,58	0,20	0,12	0,06

Tab. 3 : ZUM BINDUNGSVERHALTEN VON ISOAMYLASEN AN DIE ABPF

Sättigungsversuche wie in Tab. 2 .

In drei Fällen wurde MA^+ an den Kurvenverlauf in Abb. 6 graphisch adaptiert (^{x}) .

Datenpaare mit AML < 10 mU wurden nicht berücksichtigt.

MA^+/AML gibt das Verhältnis von gebundener zur freien Amylase an.

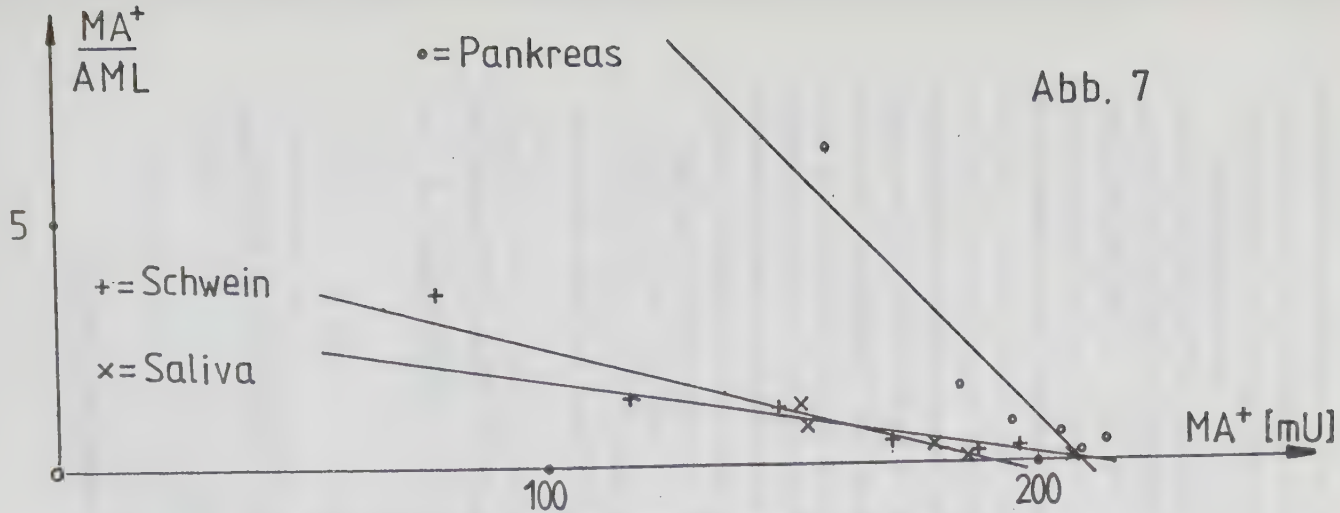


Abb. 7 : ZUM BINDUNGSVERHALTEN DER ISOAMYLASEN AN DIE ABPF

Graphische Darstellung der Daten aus Tab. 3 (Scatchard - Plot) .

Abszisse: gebundener Anteil an Amylase (MA^+)

Ordinate: Verhältnis gebundenem zu freiem Anteil an Amylase (MA^+/AML)

Kenngrößen der Geraden:

	PANKREASAMYLASE	SCHWEINEAMYLASE	SALIVAAMYLASE
Steigung m	-o,1o6	-o,o26	-o,o14
Abszissenabschnitt a	2o8	188	2o5
Ordinatenabschnitt b	22	4,9	2,9
Korrelationskoeffizient r	o,94	o,95	o,9o

gemessen. Die Berechnung der Kurvenpunkte potenziert diese Meßfehler noch. Diese Ausreißer sind in Abb. 6 mit einem Pfeil markiert. Sie werden zur Berechnung der Bindungskonstante an die entsprechende Kurve graphisch adaptiert. Ferner werden diejenigen Kurvenpunkte mit einem sehr niedrigen Anteil an freier Isoamylase verworfen (AML < 10 mU) , da derartig kleine Aktivitäten aus meßtechnischen Gründen nicht hinreichend genau bestimmt werden können. Diese Daten sind in Tab. 3 dargestellt.
Zusätzlich ist das Verhältnis des gebundenen Anteils der Isoamylase (MA^+) zum freien Anteil der Isoamylase (AML) angegeben. Als Scatchard-Plot (29) sind diese Daten in Abb. 7 graphisch dargestellt. Die Meßpunkte jeder Isoamylase in Abb. 7 können einer Geraden zugeordnet werden. Steigung, Achsenschnittpunkte der Geraden und Korrelationskoeffizient der Meßpunkte zur jeweiligen Geraden sind angegeben. Die Schnittpunkte aller drei Geraden mit der Abszisse liegen nahe beieinander; die Geraden der Schweineamylase und der Salivaamylase ähneln sich, die Gerade der Pankreasamylase dagegen verläuft wesentlich steiler.
Im folgenden wird die Größenordnung der Bindungskonstanten der ABPF zur jeweiligen Isoamylase berechnet:

Die Geraden in Abb. 7 haben folgende allgemeine Gleichung (29) :

$$\left[\frac{MA^+}{AML}\right] = k' (Ab_t) - k' \left[MA^+\right] .$$

k' = Bindungskonstante
Ab_t = Menge der vorhandenen Antikörper

Also ist :

$$-m = k'$$

m = Steigung der Geraden

Da MA^+ die Dimension mU hat und $\frac{MA^+}{AML}$ dimensionslos ist, hat k' die Dimension mU^{-1} .

Nach Abb. 7 beträgt die Bindungskonstante k'= -m für:

Pankreasamylase k'= o,1o6 mU^{-1}
Schweineamylase k'= o,o26 mU^{-1}
Salivaamylase k'= o,o14 mU^{-1}

Nach TAKEUCHI (34) beträgt die spezifische Aktivität für Pankreasamylase 231 U/mg und für Parotisamylase 416 U/mg. Es wird angenommen, daß dies sowohl für den hier verwendeten Harleco^R-Test als auch für die von TAKEUCHI verwendete Phadebas^R-Methode gilt (amyloklastisch), da nach KAUFMAN et al. (23) die spezifische Aktivität von Amylasen im Harleco^R-Test und im Merck^R--Test (amyloklastisch) die gleiche ist.
Demnach berechnet sich die Bindungskonstante k bei einem Molekulargewicht niedermolekularer Amylase von 50.000 u (vergleiche S. 39) in der Dimension mol^{-1} :

für Humanpankreasamylase

$$k = k' \times 231 \frac{U}{mg} \times 50.000\ u$$
$$= o,1o6 \cdot (1o^{-3}\ U)^{-1} \times 231 \frac{U}{1o^{-3}\ g} \times 50.000\ u$$
$$= 12,2 \cdot 1o^{11}\ mol^{-1}$$

für Schweinepankreasamylase

$$k = k' \times 231 \frac{U}{mg} \times 50.000\ u$$
$$= o,o26 \cdot (1o^{-3}\ U)^{-1} \times 231 \frac{U}{1o^{-3}\ g} \times 50.000\ u$$
$$= 3,0 \cdot 1o^{11}\ mol^{-1}$$

für Salivaamylase

$$k = k' \times 416 \frac{U}{mg} \times 50.000\ u$$
$$= o,o14 \cdot (1o^{-3}\ U)^{-1} \times 416 \frac{U}{1o^{-3}\ g} \times 50.000\ u$$
$$= 2,9 \cdot 1o^{11}\ mol^{-1}$$

Die Größenordnung der Bindungskonstante liegt im Bereich 10^{11} mol^{-1} . Humanpankreasamylase hat eine viermal höhere Bindungskonastante als die anderen Isoamylasen, deren Bindungskonstanten untereinander ähnlich sind.
Die Affinität der Humanpankreasamylase zu den amylasebindenden Immunglobulinen ist also größer als die der anderen untersuchten Isoamylasen.

Tab . 4 : ZUR BEEINFLUSSUNG DER AMYLASEAKTIVITÄT DURCH DIE IMMUNGLOBULINBINDUNG

Aktivitätsverhalten von Pankreas-, Schweinepankreas- und Speichelamylase bei steigender Zugabe von ABPF.

n: Anzahl der Messungen
$\bar{x}$: Mittelwert (U/l)
s: Standardabweichung (U/l)

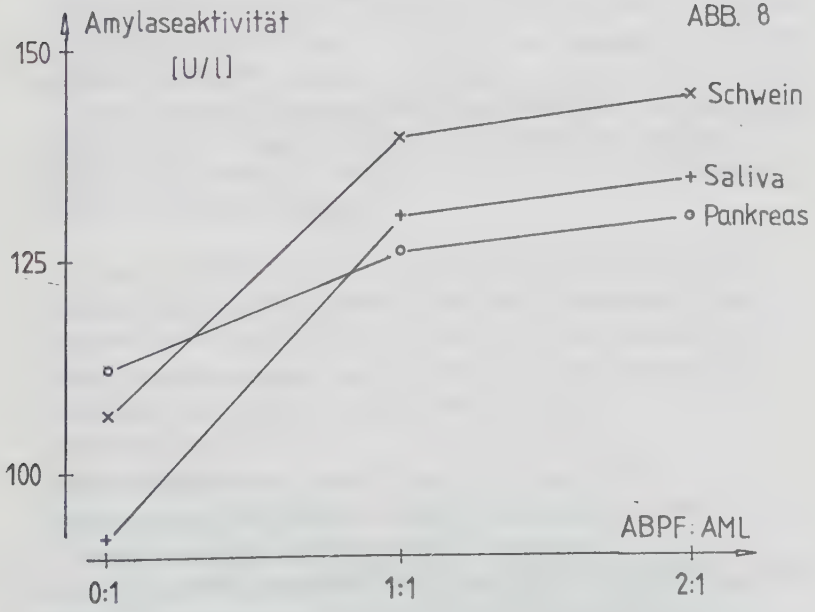
Abb . 8 : Graphische Darstellung der Daten aus Tab. 2

Abszisse: Verhältnis von ABPF zu Amylase
Ordinate: mittlere Aktivität der Ansätze in U/l

TAB. 4

n = 5	ABPF : AML		
	0 : 1	1 : 1	2 : 1
AMYLASEART [U / l] Pankreas	$\bar{x}$ = 112,0 s=2,57	$\bar{x}$ = 126,0 s=4,60	$\bar{x}$ = 129,9 s=6,45
Schwein	$\bar{x}$ = 106,6 s=7,88	$\bar{x}$ = 139,7 s=10,2	$\bar{x}$ = 144,3 s=6,40
Saliva	$\bar{x}$ = 91,3 s=13,7	$\bar{x}$ = 130,3 s=3,66	$\bar{x}$ = 134,3 s=10,4

ABB. 8



3.4. Beeinflussung der Amylaseaktivität durch die Immunglobulinbindung

Die Restaktivität der ABPF betrug 16 U/l (siehe 3.2.). In den Ansätzen mit 100 µl ABPF, 50 µl Amylase und 1500 µl Albumin wird diese Restaktivität auf 0, 97 U/l verdünnt (Verdünnung 1 : 16,5). In den Ansätzen mit 50 µl ABPF, 50 µl Amylase, 50 µl Puffer und 1500 µl Albumin wird diese Restaktivität auf 0, 48 U/l verdünnt (Verdünnung 1 : 33). Nach Abzug der Restaktivitäten werden jeweils Mittelwert und Standardabweichung aus fünf Einzelmessungen berechnet.
Die Meßergebnisse dieses Versuchs sind in Tab. 4 aufgeführt und in Abb. 8 graphisch dargestellt.
Damit zeigt sich, daß durch den Einfluß von ABPF die Amylaseaktivität zunimmt. Dies gilt für alle drei untersuchten Isoamylasen.
Mit Hilfe des WILCOXON - Tests +) wird gezeigt, daß ein signifikanter Unterschied in der Aktivität von gebundener und freier Amylase besteht: Die Aktivitätsunterschiede von ABPF:AML=0:1 und ABPF:AML=2:1 sind mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von = 0,05 signifikant.

+) Wissenschaftliche Tabellen Geigy, Basel 1973, 7. Auflage, Seite 193.

3.5. Temperaturabhängigkeit der katalytischen Aktivitäten der Isomylasen und Makroamylase

Jeder Meßpunkt ist der Mittelwert einer Dreifachbestimmung.
Für jede Amylaseaktivität wird der bei 25° C gemessene Wert als Bezugsgröße gewählt: Aktivität = 1 .
Die Werte bei höheren Temperaturen werden auf 25° C bezogen.

3.5.1. Messung mit Merckotest^{R}

In Abb. 9 (oben) wird das Temperaturverhalten des Makroamylasämieserums, des Pankreatitisserums und des Parotitisserums dargestellt. Die absoluten Werte bei 25° C betragen im Mittel:

- Makroamylasämieserum 74 U/l
- Pankreatitisserum 76 U/l
- Parotitisserum 67 U/l .

Die steigende Reaktionstemperatur führt zu einer Zunahme der Amylaseaktivitäten. Makroamylase spricht stärker auf höhere Temperaturen an als Pankreatitisserum und Parotitisserum.

In Abb. 9 (Mitte) wird das Temperaturverhalten von Pankreasamylase (Duodenalsaft) und Schweinepankreasamylase sowie deren Mischungen mit ABPF, also in vitro gebildeter Makroamylase, dargestellt. Die absoluten Werte bei 25° C betragen im Mittel:

- Pankreasamylase (P) 131 U/l
- Pankreasamylase + ABPF (MP) 154 U/l
- Schweineamylase (S) 127 U/l
- Schweineamylase + ABPF (MS) 126 U/l

Beide in vitro hergestellten Makroamylasen (MP und MS) zeigen gegenüber den entsprechenden ungebundenen Amy-

lasen im Temperaturverhalten keinen signifikanten Unterschied. Ein Temperaturoptimum scheint sich bei 40° C auszubilden.

3.5.2. Messung mit der Phadebas^{R} - Methode

In Abb. 9 (unten) wird das Temperaturverhalten von Pankreatitisserum und Makroamylasämieserum dargestellt. Die absoluten Werte betragen im Mittel:

-Pankreatitisserum (Pankr) 76 U/l
-Makroamylaseserum (MA) 63 U/l .

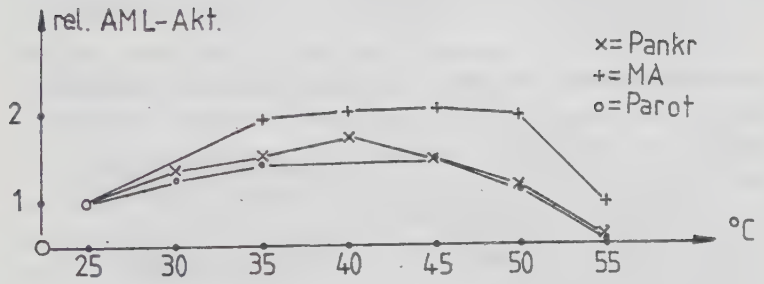
Hier fällt gegenüber den vorhergehenden Ergebnissen auf, daß mit der Phadebas^{R} - Methode ein gänzlich abweichendes Verhalten auftritt.
Es kommt zu einer absolut höheren Aktivierung, die bei 50 - 55 °C anhält und nicht wie in den vorhergehenden Untersuchungen bei 50 °C wieder rückgängig war.
Makroamylaseserum und Pankreatitisserum unterscheiden sich in ihrem Temperaturverhalten in diesem Versuch nicht.

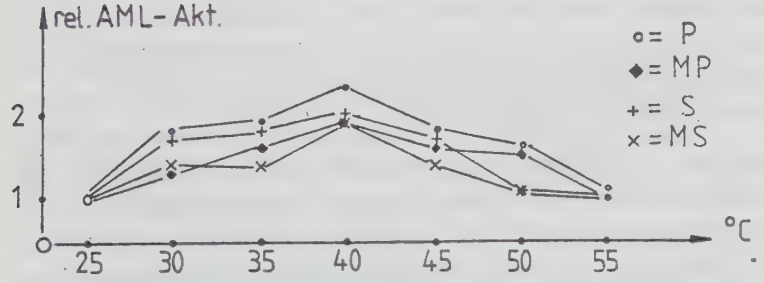
Abb. 9 : ZUR TEMPERATURABHÄNGIGKEIT DER KATALYTISCHEN AKTIVITÄTEN DER ISOAMYLASEN

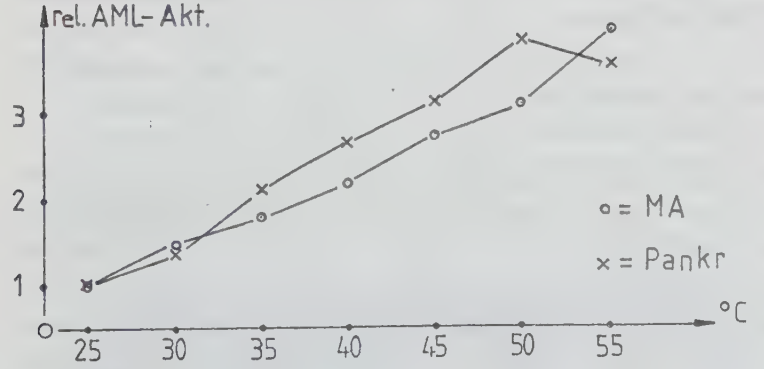
Abszisse: Meßtemperatur (°C)
Ordinate: relative Amylaseaktivität (25°C ≙ 1)

oben: Temperaturverhalten von Makroamylaseserum (MA), Pankreatitisserum (Pankr) und Parotitisserum (Parot) im Merckotest^{R} .
Mitte: Temperaturverhalten von Pankreasamylase (P), Schweinepankreasamylase (S) sowie deren Mischungen mit ABPF (MS, MP) im Merckotest^{R} .
unten: Temperaturverhalten von Pankreatitisserum (Pankr) und Makroamylaseserum (MA) im Phadebas^{R} - Test .

ABB. 7


rel. AML-Akt.
x= Pankr
+= MA
o= Parot
2
1
°C
25
30
35
40
45
50
55


rel. AML- Akt.
o= P
◆= MP
+ = S
x = MS
2
1
°C
25
30
35
40
45
50
55


rel. AML- Akt.
3
2
1
o = MA
x = Pankr
°C
25
30
35
40
45
50
55

4. DISKUSSION

Die hier vorliegende Makroamylase besitzt in der Gelchromatographie mit Sephadex^{R} ein Molekulargewicht von etwa 450.000 .

Niedermolekulare Amylase (50.000 u) besitzt eine Affinität zu Sephadex^{R} (36) und wird verzögert, also später als ihrem Molekulargewicht entspricht, eluiert. Auch in Abb. 3 wird niedermolekulare Amylase bei den Serumfraktionen eluiert, die Moleküle mit kleineren Molekulargewichten als Amylase enthalten (vergl. 30, Seite 20).

Bei Makroamylase ist dieser Effekt wahrscheinlich ebenfalls vorhanden. Damit könnte das Molekulargewicht der Makroamylase unterschätzt werden, also größer sein als 450.000 .

Die hier vorliegende Makroamylase besteht aus IgA und "normaler", niedermolekularer Amylase (5, 35). Das Molekulargewicht der monomeren Form von IgA wird mit 162.000 (38, Seite 1370 - 1373) angegeben, das Molekulargewicht von niedermolekularer Amylase mit etwa 50.000 (3) .

Somit ist die hier vorliegende Makroamylase größer als ein Komplex aus einem monomeren IgA - Molekül und einem Amylasemolekül.

Es wäre denkbar, daß normalgroße Amylase nicht mit der monomeren, sondern mit der dimeren Form des IgA verbunden ist.

Die dimere Form des IgA kommt zumeist in Sekreten vor und ist mit einer "Sekretkomponente" assoziiert, die über Disulfidbrücken kovalent zwei IgA - Moleküle verbindet. Sie hat ein Molekulargewicht von 395.000 (9, Seite 207f.) .

Das Molekulargewicht des hier vorliegenden Falles von Makroamylase könnte so durch die folgende Hypothese erklärt werden:
Es befindet sich amylasebindendes, dimeres IgA in einem Sekret unserer Patientin (z.B. Dünndarmsekret) und wird resorbiert. In der Blutbahn verbindet es sich mit ein oder zwei Molekülen Amylase. Es entsteht Makroamylase mit einem Molekulargewicht von 435.000 oder 485.000 .

Die Molekulargewichte der früher untersuchten Makroamylasen liegen zwischen 160.000 und mehr als einer Million (4, 26, 27, 35, 36) . Das Molekulargewicht der von BOSSECKERT et al. (6) untersuchten Makroamylase kommt mit 398.000 dem hier untersuchten Fall nahe.

Die unterschiedlichen Molekulargewichte anderer Makroamylaseformen können dadurch bedingt sein, daß eine unterschiedliche Form von IgA vorliegt, z.B. IgA in seiner monomeren oder trimeren Form (9, Seite 207f.) , daß Amylase nicht an ein Immunglobulin vom Typ IgA gebunden ist, sondern z.B. von den Typen IgG oder IgM (15) , ferner können überhaupt keine Immunglobuline an der Komplexbildung mitbeteiligt sein, sondern es kann sich z.B. um Makroamylase aus Polysaccharid - Amylasekomplexen handeln (33) .

Die Makroamylase dissoziiert bei saurem pH reversibel in niedermolekulare Amylase und eine amylasebindende Proteinfraktion (ABPF) (39) .

Die ABPF bildet bei neutralem pH nach Zugabe verschiedener Isoamylasen wiederum Makroamylase. Die ABPF wurde im präparativen Maßstab hergestellt, vergleichbar mit den Arbeiten von LEVITT et al. (27) , BERK et al. (3), HANSEN et al. (13) , SPIEGEL et al. (31) , FRIDHANDLER et al. (12) und HARADA et al. (15) .

Mit Hilfe der ABPF prüften wir nach, ob die amylasebindenden Immunglobuline ein unterschiedliches Bindungsverhalten gegenüber verschiedenen Isoamylasen, nämlich heterologer Schweinepankreasamylase, isologer Pankreasamylase und autologer Speichelamylase aufweisen.

LEVITT et al. (11, 27) zeigten, daß die Seren von vier Patienten mit Makroamylasämie radioaktiv markierte humane Speichelamylase banden. Unmarkierte Speichelamylase von Mensch und Pavian sowie Pankreasamylase vom Schwein zeigten gegenüber den bindenden Immunglobulinen unterschiedliche Bindungsaffinitäten: Das Serum eines Patienten band überwiegend menschliche Speichelamylase. Das Serum eines anderen Patienten, der längere Zeit mit Pankreasextrakten des Schweins therapiert wurde, zeigte eine starke Affinität zu Schweineamylase.

FRIDHANDLER et al. (11,12) trennten bei pH 3,4 durch Gelchromatographie 30 Makroamylaseseren und isolierten deren amylasebindenden Proteine. In 26 der 30 Fälle wurden von diesen Speichelamylase mit höherer Affinität gebunden als Pankreasamylase, in drei Fällen war es umgekehrt und in einem Fall war kein Unterschied in der Bindungsaffinität feststellbar.

In fünf Fällen prüften KANNO et al. (22) die Bindungsfähigkeit von amylasebindenden Immunglobulinen einerseits durch Zusatz von Pankreas- oder Speichelamylase zum Patientenserum, das Überschuß an amylasebindenden Immunglobulinen enthielt, und andererseits durch Zusatz zu den präparierten Immunglobulinfraktionen. In zwei Fällen wurden sowohl Pankreas- als auch Speichelamylase an die Immunglobuline des Serums gebunden, in zwei Fällen konnten nur Pankreasamylase und in einem Fall nur Speichelamylase an die Immunglobuline des Serums gebunden werden. Die durch

Gelfiltration bei saurem pH gewonnenen Immunglobuline banden im letzten Fall lediglich Speichelamylase (es handelte sich um Immunglobulin vom Typ IgG) und in den anderen getesteten Fällen sowohl Speichel- als auch Pankreasamylase (zweimal IgG, zweimal IgA) .

KACZMAREK et al (21) gelang es, durch Bindungsstudien mit gereinigter Pankreas- bzw. Speichelamylase und normalem Humangammaglobulin in physiologischen Konzentrationen Makroamylase in vitro zu erzeugen, welche eine höhere Affinität zu Speichelamylase hatte.

Unsere Daten zeigen, daß Bindungsaffinität und -kapazität der ABPF gegenüber menschlicher Pankreasamylase eindeutig größer sind als gegenüber Schweinepankreas- und menschlicher Speichelamylase. Im Gegensatz hierzu wurde in der Mehrzahl der bisher untersuchten Makroamylasen eine stärkere Affinität gegenüber Speichelamylase festgestellt (11, 12, 21, 22, 27) .

Unsere Patientin erhielt ähnlich wie die von LEVITT et al. (27) beschriebene über einen längeren Zeitraum Pankreasextrakte des Schweins (Pankreon^{R}) zur Therapie der vermuteten Pankreaserkrankung. Anfängliche Erwartungen, die hier vorliegenden amylasebindenden Immunglobuline würden eine stärkere Affinität gegenüber Schweineamylase aufweisen, erfüllten sich nicht. Ein zeitlicher Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Makroamylasämie und der Pankreon^{R} - Therapie ist in unserem Fall jedoch nicht gegeben, da die Patientin erst nach dem Auftreten der persistierenden Hyperamylasämie mit Pankreasextrakten therapiert wurde.

Interessant scheint in unserem Fall, daß die Patientin bereits mehrere Jahre vor Auftreten der Hyperamylasämie insulinpfichtige Diabetikerin war. Sie führte sich damit über Jahre subkutan potentiell antigen-

haltiges Material (exogenes Schweinepankreas als minimale Verunreinigung des Insulins) zu.

Bei der Patientin kann auch ein gegen das Pankreas gerichteter Autoimmunprozeß vorliegen, der sich einerseits durch das Auftreten eines Diabetes mellitus und andererseits durch das Auftreten löslicher Antikörper - - Amylase - Komplexe im Blut äußern würde. Diese Hypothese könnte erklären, warum die ABPF gegenüber menschlicher Pankreasamylase ein stärkeres Bindungsverhalten zeigen.

Mit Hilfe der ABPF wurde untersucht, ob die Immunglobuline einen Einfluß auf die Enzymaktivität haben. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen eindeutig, daß die ABPF die Enzymaktivität von Amylase für das Substrat Oligosaccharide bei der Reaktionstemperatur 37^{0} C in der gewählten Testanordnung erhöhen. Dieses Ergebnis wurde statistisch und methodisch abgesichert.

In den bisherigen Untersuchungen zur Makroamylase wurde diese Fragestellung selten bearbeitet: LEVITT et al. (27) stellten bei Versuchen mit ^{125}J markierter Amylase als Nebenbefund fest, daß die amylasebindende Proteinfraktion die Enzymaktivität nicht inhibiert. Eine Aktivierung des Amylaseenzyms durch die Immunglobulinbindung wird erstmals im hier vorliegenden Fall von Makroamylase festgestellt.

Mehrfach wurde die Michaeliskonstante der Makroamylase für verschiedene Substrate im Vergleich zu normalgroßer Amylase gemessen: In unserem Makroamylasämiefall liegt ein größerer K_m - Wert als bei ungebundener Amylase vor (39) . Dies stimmt mit den Ergebnissen aus der Literatur überein (3, 7, 25) .

Nach den oben genannten Ergebnissen beeinflußt die Immunglobulinbindung der Amylase die Aktivität des

Enzyms so, daß die vom Enzym katalysierte Reaktion zwar in ihrer Geschwindigkeit bei Substratüberschuß beschleunigt ist (die Aktivität des Makroamylaseenzyms ist größer als die von normalgewichtiger Amylase), die Affinität des Enzyms zum Substrat jedoch verkleinert ist (die Michaeliskonstante von Makroamylase ist größer als die von normalgewichtiger Amylase) .

Nach LORENTZ (28) besitzt menschliche Amylase vermutlich fünf aktive Zentren. Man muß annehmen, daß das Amylasemolekül durch seine Bindung an das Immunglobulin in seiner Tertiärstruktur erheblich verändert wird. Es ist vorstellbar, daß durch diese Strukturveränderung des Amylasemoleküls bislang inaktive Zentren entfaltet, aktiviert werden und es so zu einer Stimulation der enzymatischen Reaktion bei dem vorhandenen Substratüberschuß kommt. Allerdings führt dieser Vorgang offenbar zu einer Herabsetzung der Affinität des Enzyms zum Substrat Amylose, was in dem höheren K_m - Wert der Makroamylase gegenüber ungebundener Amylase zum Ausdruck kommt.

Analog der unkompetitiven Hemmung, bei der maximale Reaktionsgeschwindigkeit und Michaeliskonstante bei Hemmung kleiner werden, kann man hier von einer u n k o m p e t i t i v e n A k t i v i e r u n g sprechen.

Nach HENDERSON et al. (18) sollen Makroamylasen gegenüber normalen Amylasen ein atypisches Temperaturverhalten zeigen. Nach der Entdeckung eines Falles von Makroamylaseämie stellten sie fest, daß bei der Messung der Amylaseaktivität des Makroamylaseserums mit der Phadebas^{R} - Methode die Erhöhung der Temperatur von 25 ^{o}C auf 45 ^{o}C einen achtfachen Anstieg der Enzymaktivität zur Folge hatte, während die Serumamylase Gesunder und Pankreatitiskranker nur um

den Faktor 4 anstieg.

Aufgrund dieses unterschiedlichen Temperaturverhaltens wurde bei einer anschließenden Untersuchung ein zweiter Fall von Makroamylase unter 100 untersuchten hospitalisierten Probanden entdeckt. Dieser zweite Fall hatte jedoch einen Temperaturfaktor von nur ca. 5 (18) .

HENDERSON et al. (17) empfahlen aufgrund dieser beiden Fälle den Temperaturtest als Screening - Methode zum Nachweis einer Makroamylasämie (17).

Daraufhin wurden in einer Feldstudie in Schottland 2109 Probanden auf Hyperamylasämie untersucht und die 39 gefundenen Fälle auf der Basis des Temperaturscreeningtests auf Makroamylase untersucht. Da kein Fall positiv war, schätzten IMRIE, KING und HENDERSON (19) die Inzidenz hyperamylasämischer Makroamylasämie auf weniger als 0,1 % (19).

Von anderen Autoren wird die Häufigkeit der Makroamylasämie, auch bei normalhohen Amylasewerten, dagegen höher eingeschätzt: BARROWS et al. (1) messen bei 440 Patienten mit verschiedenen Krankheitsbildern 2 % Patienten mit Makroamylasämie und bei 251 Gesunden 0,4 % mit Makroamylasämie. HELFAT et al. (16) messen bei 622 hospitalisierten Patienten 1,3 % mit Makroamylasämie und DÜRR et al. (10) messen bei 190 Hyperamylasämikern 1,6 % mit Makroamylasämie.

Unser Fall von Makroamylasämie wurde ebenfalls auf sein Temperaturverhalten untersucht. Dabei wurde zur Amylaseaktivitätsbestimmung zunächst der im Hause übliche Merckotest^{R} benutzt. Es wurden Makroamylaseserum mit den Seren von Pankreatitis- und Parotitispatienten und Schweinepankreas- sowie Humanpankreasamylase mit den entsprechenden in vitro gebildeten Makroamylasen verglichen.

Nach unseren Ergebnissen unterscheiden sich Makroamylase, normale Amylase und die in vitro gebildeten Makroamylasen im Temperaturverhalten nur unwesentlich.

Es sei kritisch bemerkt, daß sämtliche untersuchten Isoamylasen nicht die erwartete Reaktion auf die Temperatursteigerung gaben: Der höchste Faktor von 25 °C auf 50 °C, der bei irgendeiner Isoamylase überhaupt gemessen wurde, lag bei ca. 2 , während HENDERSON et al. (18) den Faktor 4 für normale Amylasen angeben. Einen Fehler in unserem Versuchsaufbau und in der Versuchsdurchführung konnten wir nicht finden.

Da der von HENDERSON et al. (18) vorgeschlagene Screening - Test mit der Phadebas^{R} - Methode durchgeführt wurde, wurde der Versuch mit dieser Methode wiederholt.

Aus den Ergebnissen ist ersichtlich, daß bei dieser Versuchsreihe zwar das Temperaturverhalten der Amylaseenzyme selbst der erwarteten Reaktion auf die Temperatursteigerung entsprach, jedoch sich kein unterschiedliches Temperaturverhalten von Makroamylase und normalgroßer Amylase fand.

Es läßt sich also trotz der oben angemerkten kritischen Einschränkungen schliessen, daß der in dieser Arbeit untersuchte Makroamylasefall keine "anomale Antwort auf Temperaturprüfung" (HENDERSON et al, 18) gibt.

In der Literatur wurde das Temperaturverhalten von Makroamylasen außer von HENDERSON et al. (20) nur noch in einem von BROHEE et al. (7, 8) entdeckten Fall von Makroamylasämie untersucht. BROHEE et al. stellten bei ihrem Makroamylaseserum ebenfalls keinen Unterschied im Temperaturverhalten gegenüber normalen Seren fest.

Obwohl sowohl das Makroamylasämieserum von BROHEE et al. (8) als auch unser Makroamylaseserum nahezu ausschließlich Makroamylase enthalten und kaum ungebundene Amylase, wären beide mit dem von HENDERSON et al. vorgeschlagenen Screening-Test nicht entdeckt worden.

Weitere Einschränkungen zur Validität dieses von HENDERSON et al. vorgeschlagenen Screeningtests machen FRIDHANDLER und BERK (11): Sollte der Makroamylaseanteil eines zu prüfenden Serums nur einen kleinen Teil der gesamten Serumamylase ausmachen, würde dieser Screeningtest lediglich die Eigenschaften der überwiegenden normalgroßen Amylase wiedergeben und das Vorhandensein von Makroamylase nicht erfassen.

Bei der Makroamylase handelt es sich um ein heterogenes Phänomen. Im hier vorliegenden Fall der IgA - - Makroamylasämie ist noch zu klären, ob es sich um eine echte Immunreaktion handelt, d.h. ob sich die Amylase mit dem Immunglobulin in Form einer Antigen--Antikörper-Reaktion verbindet.

Für das Vorhandensein eines Antigen-Antikörper-Komplexes sprechen die Dissoziabilität des Makroamylasekomplexes bei pH 3,5 (39) und die Reversibilität der Protein-Amylase-Bindung (39) . Weitergehende immunologische Untersuchungen sollten jedoch diesen Befund noch erhärten. Zum Beispiel könnte der Immunglobulinanteil der Makroamylase durch Pepsin gespalten werden, die Bruchstücke durch Gelfiltration getrennt und nachgeprüft werden, ob sich Amylase in der Fraktion mit den F(ab) - Fragmenten oder der Fraktion mit den F(c) - Fragmenten befindet. Sollte Amylase noch mit den F (ab) - Fragmenten assoziiert sein, wäre anzunehmen, daß eine Antigen-Antikörper-Bindung vorliegt (vergl. 9, Seite 210f.) .

Sollte es sich um eine echte Immunreaktion handeln, so ist eine Autoimmunreaktion oder eine Fremdimmunreaktion zu diskutieren.

Für das Vorliegen einer Autoimmunreaktion könnte die Tatsache sprechen, daß unsere Patientin Diabetikerin ist. Die Autoimmunreaktion könnte sowohl gegen den endokrinen Teil des Pankreas gerichtet sein und zum Diabetes mellitus geführt haben als auch gegen den exokrinen Teil des Pankreas gerichtet sein, was sich durch das Auftreten von löslichen Amylase-Antikörper--Komplexen im Serum äußert.

Eine Fremdimmunreaktion könnte durch die langdauernde Einnahme allergenen Pankreasextrakten des Schweins (Pankreon^{R}) bedingt sein. Dafür spräche die Beteiligung des Schleimhautimmunglobulins, denn über den obengenannten pathogenen Mechanismus käme das Allergen Pankreasamylase vom Schwein mit Epithelien in Kontakt.

Die erstere dieser beiden oben genannten Hypothesen wird durch die beschriebenen Untersuchungen über das Bindungsverhalten der ABPF unterstützt, die offenbar humane Pankreasamylase bevorzugen und damit signalisieren, daß diese Isoamylase eine Immunreaktion verursacht haben könnte. Bei einer gegen das Pankreas gerichteten Immunreaktion wäre es denkbar, daß die gebildeten Antikörper eine besonders starke Affinität zu Pankreasamylase, bei einer solchen gegen Schweineamylase eine besonders starke Affinität gegen Schweineamylase besitzen (9, Seite 427) . Die Untersuchung, ob bei insulinpflichtigen Diabetikern gehäuft Makroamylase auftritt, könnte weitere Aufschlüsse geben.

Die Aktivitätsvergleiche von gebundener und freier Makroamylase zeigen, daß die amylasebindenden Immunglobuline das biologische Verhalten z.B. des Amylaseenzyms beeinflussen können, also im vorliegenden Fal-

le enzymaktivierende Antikörper sind. Ähnliche Versuche an anderen Fällen von Makroamylasämie könnten zeigen, ob es sich hier lediglich um ein Einzelphänomen handelt.

==========

5. ZUSAMMENFASSUNG

1. In der vorliegenden Arbeit wird ein neuer Fall von Makroamylasämie auf seine biochemischen Eigenschaften untersucht. Der 'Fall' wurde aufgrund einer persistierenden Hyperamylasämie bei fehlenden Zeichen von Pankreatitis, Parotitis oder Niereninsuffizienz entdeckt.
   Diese Makroamylase besteht aus IgA, das mit Amylase assoziiert ist.

2. Die Abschätzung des Molekulargewichts des Amylase - - Immunglobulin - Komplexes erfolgt mit der Gelchromatographie an Sephadex^{R} G 200 sf und ergibt ein Molekulargewicht von rund 450.000 , während das normalgroßer Amylase bei etwa 50.000 liegt.

3. Es wird die Präparation von amylasebindenden Proteinfraktionen nach Dissoziation des Makroamylasekomplexes bei saurem pH durch Gelchromatographie mit Sephadex G 100 beschrieben.

4. Mit der präparierten amylasebindenden Proteinfraktion und heterologer und isologer Pankreasamylase sowie autologer Speichelamylase werden Versuche zum Bindungsverhalten mit chromatographischen Methoden durchgeführt.
   Die amylasebindenden Immunglobuline besitzen gegenüber menschlicher Pankreasamylase eine deutlich höhere Bindungskapazität und Bindungsaffinität als gegenüber den anderen untersuchten Isoamylasen.

5. Erstmals wurde nachgewiesen, daß Immunglobuline durch ihre Bindung an Amylase die Enzymaktivität von Amylase erhöhen.

6. Im Gegensatz zu früher untersuchten Fällen, in denen ein achtfacher Anstieg der Aktivität der Makroamylase gegenüber einem nur vierfachen Anstieg der Aktivität niedermolekularer Amylase bei einer Erhöhung der Reaktionstemperatur von 25 °C auf 45 °C erfolgte, konnte bei diesem Fall von Makroamylasämie keine übernormale Aktivitätssteigerung bei Temperaturerhöhung nachgewiesen werden. Ein auf diesem Unterschied zwischen Makroamylase und normaler Amylase basierender, in der Literatur beschriebener Screening-Test auf Makroamylasämie besitzt deshalb keine generelle Aussagekraft und kann laut vorliegender Daten nicht empfohlen werden.

6. LITERATURVERZEICHNIS

(1) BARROWS, D., J.E. BERK and L. FRIDHANDLER: Macroamylasemia - Survey of Prevalence in a Mixed Population. New Eng. J. Med. 286, 1352 (1972).

(2) BERK, J.E., H. KIZU, P. WILDING and R.I. SEARCY: Macroamylasemia: A Newly Recognized Cause for Elevated Serum Amylase Activity. New Eng. J. Med. 277, 941 - 946 (1967).

(3) BERK, J.E., H. KIZU, E. GELLER and L. FRIDHANDLER: Macroamylasemia: Observations on the Nature of the Macroamylase. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 131, 154 - 159 (1969).

(4) BERGGREN, T. and M.D. LEVITT: An unusual form of macroamylasemia. Gastroenterology 67, 149 - 154 (1974).

(5) BOHNER, J., W. STEIN, J. DILGER und M. EGGSTEIN: Amylase-Immunglobulin-Komplexe im Serum einer Diabetikerin. Verh. Dt. Ges. Inn. Med. 85, 1029 - - 1033 (1979).

(6) BOSSECKERT, H. und K. WINNEFELD: Säulenchromatographische Untersuchungen zur Abklärung einer Makroamylasämie. Dtsch. Z. Verdau. Stoffwechselkr. 29, 419 - 424 (1969).

(7) BROHEE, D. et A. DELCOURT: La macroamylasémie. Acta gastro-ent. belg. 40, 317 - - 328 (1977).

(8) BROHEE, D., R. NAEIJE, A. VAN MELSEN et A. DEL= COURT: Macroamylasémie: A propos d'un cas. Acta gastro-ent. belg. 40, 353 - - 359 (1977).

(9) BUNDSCHUH, G. und B. SCHNEEWEISS (Hrsg.): Immunologie: ein Nachschlagewerk. 2., bearb. Aufl. Stuttgart, New York: Fischer 1979.

(10) DÜRR, H.K., D. BINDRICH and J.Ch. BODE: The Frequency of Macroamylasemia and the Diagnostic Value of the Amylase to Creatinine Clearance Ratio in Patients with Elevated Serum Amylase Activity. Scand. J. Gastroenterology 12, 701 - - 705 (1977).

(11) FRIDHANDLER, L. and J.E. BERK: Macroamylasemia. Adv. Clin. Chem. 20, 267 - 286 (1978).

(12) FRIDHANDLER, L., J.E. BERK and D. WONG: Affinity Characteristics of Amylase--Binding Substance(s) Prepared From Macroamylase Complexes. Clin. Chem. 20, 22 - 25 (1974).

(13) HANSEN, H.R., H. VAN KLEY and W.A. KNIGHT, Jr.: Binding Site for Amylase in Macroamylasemia. Gastroenterology 62, 759 (1972) Abstr. .

(14) HANSEN, H.R., H. VAN KLEY and W.A. KNIGHT, Jr.: Macroamylasemia Due to Binding by Protein. Am. J. Med. 52, 712 - 720 (1972).

(15) HARADA, K., T. NAKAYAMA, M. KITAMURA and T. SUGIMOTO: Immunological and electrophoretical approaches to macroamylase analysis. Clin. Chim. Acta 59, 291 - 299 (1975).

(16) HELFAT, A., J.E. BERK and L. FRIDHANDLER: The Prevalence of Macroamylasemia. Further Study. Am.J. Gastroenterol. 67, 54 - 58 (1974).

(17) HENDERSON, A.R., J. KING and H.G. MORGAN: A Screening Procedure for Macroamylasemia. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 29, Suppl. 126, 21.19 (1972).

(18) HENDERSON, A.R., J. KING and C.W. IMRIE: Anomalous Response of Macroamylase to Assay Temperature. Clin. Chem. 19, 123 - 124 (1973).

(19) IMRIE, C.W., J. KING and A.R. HENDERSON: Macroamylasemia - Survey of Prevalence in a Mixed Population.
New Engl. J. Med. 287, 931 (1972).

(20) IMRIE, C.W., J. KING and A.R. HENDERSON: Macroamylasemia: A Report of Two Cases.
Scot. Med. J. 18, 188 - 191 (1973).

(21) KACZMAREK, M.J. and H. ROSENMUND: The role of gamma - globulin in composition of macroamylase.
Clin. Chim. Acta 79, 183 - 187 (1977).

(22) KANNO, T. and K. SUDO: Properties of amylase - - linked immunoglobulins.
Clin. Chim. Acta 76, 67 - 77 (1977).

(23) KAUFMAN, R.A. and N.W. TIETZ: Recent Advances in Measurement of Amylase Activity - A Comparative Study.
Clin. Chem. 26, 846 - 853 (1980).

(24) KITAMURA, T., K. YOSHIOKO, M. EHARA and H. AKEDO: A study on the nature of macroamylase-complex: Dissociation of macroamylase by substrates.
Gastroenterology 73, 46 - 51 (1977).

(25) LEVITT, M.D. and S.R. COOPERBAND: Hyperamylasemia from the Binding of Serum Amylase by an 11S IgA Globulin.
New Eng. J. Med. 278, 474 - 478 (1968).

(26) LEVITT, M.D., E.J. GOETZL and S.R. COOPERBAND: Two Forms of Macroamylasemia. Lancet 1, 957 - 958 (1968).

(27) LEVITT, M.D., W.C. DUANE and S.R. COOPERBAND: Study of macroamylase complexes. J. Lab. Clin. Med. 80, 414 - 422 (1972).

(28) LORENTZ, K.: Alpha-Amylase Assay: Current State and Future Development. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 17, 499 - 504 (1979).

(29) SCATCHARD, G.: Ann. N.Y.Acad. Science 51, 660 - - 672 (1948/1951).

(30) Sephadex^{R}. Gel filtration in theory and practice. Pharmacia Fine Chemicals AB. (1971).

(31) SPIEGEL, M., O. OELZ, M. KNOB und U. BINSWANGER: Makroamylase als seltene Ursache der Hyperamylasämie. Klin. Wschr. 50, 548 - 551 (1972).

(32) STEIN, W., J. BOHNER und M. EGGSTEIN: Chromatographisches Verhalten, Spezifität und enzymkinetische Eigenschaften eines Amylase-Immunglobulin-Komplexes. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 17, 192 (1979).

(33) TAKE, S., L. FRIDHANDLER and J.E. BERK: Macroamylasemia: possible role of polysaccharide in composition of macroamylase. Clin. Chim. Acta 27, 369 - 371 (1970).

(34) TAKEUCHI, T.: Human Amylase Isoenzymes Separated on Concanavalin A-Sepharose. Clin. Chem. 25, 1406 - 1410 (1979).

(35) UEDA, M., J.E. BERK, L. FRIDHANDLER and J. DAVIS: Ultracentrifugal characteristics of macroamylasemic serum. Clin. Chim. Acta 35, 299 - 304 (1971).

(36) WARSHAW, A.L. and K.H. LEE: Macroamylasemia and Other Chronic Nonspecific Hyperamylasemias: Chemical Oddities or Clinical Entities? Am. J. Surg. 135, 488 - 493 (1978).

(37) WILDING, P., W.T. COOKE and G.I. NICHOLSON: Globulin-bound Amylase. A Cause of Persistently Elevated Levels in Serum. Ann. Inn. Med. 60, 1053 - 1059 (1964).

(38) WILSON, G.S. and A. MILES: Principles of Bacteriology, Virology and Immunity, Vol. 2 . Sixth Edition in two Volumes. London: Edward Arnold 1975.

(39) WIRTH, K.: Elektrophoretische und enzymkinetische Methoden zur Untersuchung einer IgA - - Makroamylase. Dissertation an der Universität Tübingen. Noch unveröffentlicht.

LEBENSLAUF

Am 22. 05. 1955 wurde ich, Wolfgang Thomas Dieter Ils, als Sohn des Maximilian Ils und seiner Ehefrau Frieda, geb. Vaas, in Neu-Ulm geboren.
Von 1962 bis 1966 besuchte ich in Ulm/Donau die Grundschule. Danach trat ich in das Kepler-Gymnasium Ulm ein, wo ich am 15. 06. 1974 das Abitur bestand.
Vom 01. 10. 1974 bis zum 30. 09. 1976 diente ich zwei Jahre bei der Bundeswehr.
Mein Medizinstudium begann ich zum WS 1976/77 an der Universität Ulm (MNH). Dort legte ich auch die ärztliche Vorprüfung am 26. 08. 1978 ab.
Das klinische Studium begann ich zum WS 1978/79 an der Universität Tübingen. Gleichzeitig arbeitete ich ab November 1978 an der vorliegenden Dissertation an der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. M. Eggstein. Nach dem Bestehen des ersten Abschnittes der ärztlichen Prüfung am 24. 08. 1979 heiratete ich im Jahr 1980 meine Ehefrau Ulrike, geb. Hilsenbek.
Am 21. 08. 1981 legte ich den zweiten Abschnitt der ärztlichen Prüfung ab.
Die praktische Ausbildung in der Krankenanstalt (Internatsjahr) erfolgte an den Universitätskliniken Tübingen mit dem Wahlfach Radiologie vom 19. 10. 1981 bis zum 19. 09. 1982.
Am 29. 10. 1982 bestand ich den letzten Abschnitt der ärztlichen Prüfung.

lifo druck
laubanger 15
8600 bamberg
tel. 0951/64321